Informe Trimestral

Actividades realizadas como parte de lo contemplado en acuerdo formal entre Minera Panamá S.A (MPSA) y The Houston Zoo Inc. (HZI-EVACC) para la conservación y manejo *ex situ* de Especies de Interés (EdI) de Anfibios encontrados dentro del área del Proyecto Mina de Cobre Panamá.

Presentado por:

Edgardo J. Griffith
Supervisor de Proyecto de Conservación de Especies de Interés--Anfibios
Minera Panamá S.A.



Período
1 de Abril al 30 de Junio, 2014

1. Introducción

De acuerdo a lo establecido originalmente en el acuerdo formal celebrado entre Minera Panamá S.A. (MPSA) y The Houston Zoo Inc. (HZI) en el cual MPSA se compromete a financiar en su totalidad la construcción de espacio físico para ser anexadas a las instalaciones creadas y financiadas por HZI, de El Centro de Conservación de Anfibios de El Valle (EVACC, por sus siglas en inglés) ubicado en el zoológico El Níspero, El Valle de Antón, Coclé. Adicionalmente en el mencionado acuerdo MPSA se ha comprometido en proveer toda la coordinación logística necesaria, antes, durante y después (mientas el acuerdo se encuentre vigente) de que finalicen las actividades de rescate y translocación de Especies de Interés (EdI) de anfibios que ocurren dentro del área de la concesión del Proyecto Mina de Cobre Panamá.

En mencionado acuerdo ambas partes entienden la necesidad de crear espacio adicional a la infraestructura del EVACC y convienen en la construcción de un anexo, que constara de dos laboratorios con suficiente espacio físico (aproximadamente 20 m^2 cada uno) para alojar a los individuos de las cuatro EdI que necesitan ser rescatadas del área que será afectada directamente por las actividades de construcción del sitio de la mina y posterior extracción de cobre del Proyecto.

Teniendo en cuenta que el objetivo fundamental de éste acuerdo es el de trabajar en colaboración para lograr rescatar y conservar especies de anfibios de interés o amenazados, dentro del área del Proyecto, concentrándonos en aquellas especies cuyas poblaciones se verán afectadas por las actividades de extracción mineral a desarrollarse en ésta zona, se encuentren amenazados de extinción o que de alguna manera sus poblaciones hayan experimentado declinaciones masivas en los últimos años por la acción del hongo quitridio y/o pérdida del hábitat.

En este informe se reportan las actividades más sobresalientes ejecutadas durante los tres últimos meses y que están encaminadas a lograr la ejecución del vigente acuerdo, entre Minera Panamá S.A. y The Houston Zoo Inc-EVACC. Además, se reportan las actividades realizadas conjuntamente con el personal de la instalación en Gamboa del Proyecto de Rescate y Conservación de Anfibios (PARC), el cual es un proyecto llevado por El Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales en Panamá y que también tienen un acuerdo para la conservación de EdI de anfibios con Minera Panamá S.A.

2. Actividades en campo

Entre abril y junio, del presente año, se han realizado un total de 16 giras de campo a nueve sitios diferentes dentro del área del Proyecto (tabla 1). Las giras de campo realizadas han sido efectuadas en horarios diurnos y nocturnos, y las mismas tienen como objetivo principal buscar y colectar EdI, las cuales formaran parte del programa de manejo *ex situ* en El Centro de Conservación de Anfibios de El Valle (EVACC). Estos trabajos de campo también nos permiten verificar la presencia o ausencia de las EdI dentro de un área específica en el área del Proyecto, lo cual es absolutamente necesario para tener un mejor

conocimiento de la distribución real de dichas especies dentro de la huella del Proyecto.

Adicionalmente, se monitorea el estatus de las poblaciones de otras especies de anfibios que no pertenecen a la lista de EdI, para lo cual se han colectado muestras de piel de todos los anfibios encontrados durante las giras de campo, las cuales son analizadas mediante la técnica de PCR cuantitativo, para determinar la presencia/prevalencia del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) en la zona. Dedibo a estos estudios realizados a todos los anfibios encontrados, se ha podido verificar la presencia del hongo Bd en el área del Proyecto, lo cual incrementa los riesgos y amenazas que enfrentan los anfibios.

Entre abril y junio, se fueron colectados un total de 22 individuos, divididos de la siguiente forma; 19 *Atelopus varius* provenientes de los sitios llamados, Quebrada Valle Grande y Quebrada de la toma de agua de Nuevo Petaquilla; además de tres individuos de *Oophaga vicentii* provenientes de Quebrada Toma de agua de Nuevo Petaquilla. Del total anterior de individuos colectados, 12 individuos de *A. varius y* tres de *O. vicentii*, fueron llevados a las instalaciones del PARC, en Gamboa, y 7 fueron llevados a EVACC.

A pesar de que se ha realizado una búsqueda intensiva de la especies *C. evanesco* y *Gastrotheca cornuta*, ambas especies nocturnas, no se ha logrado encontrar poblaciones de las mismas en los 9 sitios visitados, durante este periodo.

Adicionalmente, fueron colectadas 86 muestras de piel para análisis del hongo Bd, y las mismas corresponden a un total de 18 especies de anfibios encontrados durante las giras de campo.

Como parte de las actividades de campo realizadas dentro del proyecto en el mes de Mayo, se instalación de 4 censores para monitorear parámetros ambientales, tales como humedad relativa, temperatura del aire y del agua, en dos de los sitios donde hemos realizado colectas de EdI dentro del área del proyecto. Dichos dispositivos electrónicos nos permiten monitorear los mas leves cambios en las diferentes tazas de Temperatura (T) y Humedad Relativa (HR), lo cual es fundamental conocer con el mayor detalle posible para de esta manera intentar “recrear” dichas condiciones artificialmente en las instalaciones de EVACC y PARC. La T y HR están íntimamente relacionados con la estacionalidad y ciclos de vida asociadas a las áreas especificas en donde normalmente se reproducen las EdI que nos interesan.



Foto 1. Censor temperatura agua QVG



Foto 2. Censor HR, QVG.



Foto 3. Censor temperatura agua RDM



Foto 4. Censor HR, RDM.

Tabla 1. Sitios visitados por fecha y número de individuos colectados/muestreados por sitio.

Sitio visitado	**Fecha de visita**	**Animales colectados/visita**	**EdI—Anfibios colectados**	**Muestras de piel**	**Tipo de visita**	**Comentario**
Parte baja Q. Valle Grande	08 Abr. 14	4	*A. varius*	7	Diurna	Llevados a EVACC 2 machos, 2 juveniles. (2.0.2)
Nuevo Chicheme	09 Abr. 14	0	--	6	Diurna/ Nocturna	Búsqueda de *Gastrotheca cornuta*
Nuevo Chicheme	10 Abr. 14	0	--	10	Diurna/ Nocturna	Búsqueda de *Gastrotheca cornuta*
Quebrada Valle Grande	25 Abr. 14	0	--	8	Nocturna	Búsqueda de *Gastrotheca cornuta/A. varius*
Quebrada Valle Grande	26 Abr. 14	4	*A. varius*	8	Diurna	4.0.0. *A. varius* (Gamboa) 3 (0.0.3) liberados)\
Nuevo Petaquilla	27 Abr. 14	4	*A. varius*	8	Diurna/ Nocturna	4.0.0 (Gamboa) Q. toma de agua Nvo. Petaquilla.
Nuevo Petaquilla	28 Abr. 14	7	*A. varius*	12	Diurna/ Nocturna	4.0.3. (4Gamboa 3 EVACC) Q. toma de agua Nvo. Petaquilla.
Nuevo Petaquilla	29 Abr. 14	3	*Oophaga. vicentei*	3	Diurna	Q. toma de agua Nvo. Petaquilla.
Camino Acceso	8 Jun. 14	**0**	--	**3**	Diurna	Avanzada a lo largo de Rio Chicheme
Q. Valle Grande	10 Jun. 14	**0**	--	2	Diurna	Busqueda rio arriba, Cuenca Molejon.
Quebrada Brazo	17 Jun. 14	**0**	**--**	**4**	Diurna	Sub-cuenca Rio Botija
Quebrada Brazo	18 Jun. 14	0	--	2	Diurna	Continuamos búsqueda de dia anterior
Q. Valle Grande	19 Jun. 14	0	--	3	Diurna	2 indivoduos jóvenes *A. varius* observados.
	Total EdI Colectados	**22**	**Total muestras de piel**	**8 6**		

3. Mantenimiento de animales colectados en las instalaciones del (EVACC) y PARC (Gamboa)

Una vez los individuos han sido colectados y mantenidos temporalmente en el contenedor para anfibios ubicado en el área del Proyecto (específicamente en el área del vivero), los mismos son trasladados cuidadosamente y siguiendo el protocolo establecido por el EVACC o PARC, de acuerdo a la especie.

A medida que avanzamos con los trabajos de búsqueda, rescate y transporte de animales desde MPSA a EVACC o PARC (Gamboa), los mismos son sometidos a un riguroso proceso de cuarentena, siguiendo normas de bioseguridad específicas. Durante el proceso de cuarentena los animales son tratados contra el hongo Bd y se monitorea la carga parasitaria, mediante análisis continuo de las heces. Los tratamientos antiparasitarios son administrados de acuerdo a los resultados del análisis fecal. Una vez que los animales colectados se encuentran en las instalaciones del EVACC o PARC, los mismos son alimentados con una variedad de insectos. El tipo y tamaño de los insectos proporcionados, dependerá de la especie y estadio de desarrollo del anfibio. Todos los insectos alimentados, son complementados con vitaminas y minerales necesarios para el bienestar de nuestros animales.



Foto 5. Aplicación de UV-B a animales mantenidos en las instalaciones de cuarentena de EVACC.

Actualmente en las instalaciones de EVACC se mantiene un total de 58 individuos EdI los cuales han sido colectados durante los últimos 12 meses dentro del área del Proyecto.

Las labores diarias incluyen mantener dichos animales y garantizar que los mismos reciben suficiente alimento, humedad y temperatura adecuada para su supervivencia dentro de las instalaciones del EVACC.

Además de monitorear las cargas parasitarias y aplicar tratamientos médicos necesarios para contribuir a la buena salud de los animales, diariamente los mismos son alimentados con una variada gama de insectos vivos, los cuales son enriquecidos y/o complementados con vitaminas y minerales específicos para llenar las necesidades nutricionales de las especies que mantenemos.

En el aspecto de monitoreo permanente del Bd, y dado que en cuarentena mantenemos animales que no se han tratado con Itraconazole desde diciembre del 2013, debido a razones que se explican mas adelante, a estos individuos se les ha realizado cuatro Análisis de PCR cuantitativo con el propósito de verificar los niveles de infección con el hongo Bd. El 40 % de los animales mantenidos en EVACC han resultado ser positivos para el hongo Bd, indicando una variación en los resultados a través del tiempo, lo cual puede estar relacionado con la forma en que se ha colectado la muestra.

Para ayudar a reducir las posibilidades de que ocurra una mortandad dentro de nuestras instalaciones, además de mantener un monitoreo constante del hongo Bd, mediante la toma y análisis de muestras, se mantiene la temperatura de las instalaciones del EVACC a niveles adecuados y necesarios para mantener la afectación del hongo Bd al mínimo, logrando obtener hasta el momento una alta tasa de supervivencia los animales provenientes de campo y que se encuentran en cuarentena.



Foto 6. Termómetro dentro de recinto de cuarentena de EVACC.

En el pasado mes de Febrero debido a que cierto número de animales que estaban bajo tratamiento con Itraconazole y algunos animales que ya se encontraban en el anexo **MPSA—EVACC** fallecieron, confirmamos que la especie *Atelopus varius*, procedente del área de Donoso, aparentemente manifiesta cierta intolerancia al tratamiento con Itraconazol.

Problemas similares se han observado en las ranas de esta especie que se han llevado a las instalaciones del PARC. Los individuos de *Atelopus varius* tratados con Itraconazol muestran una alta mortalidad, en comparación con otras especies de anfibios que se han mantenido y tratado en cuarentena hasta ahora.

Para tratar de erradicar el hongo Bd de los individuos de *A. varius*, colectados en el área del Proyecto, el personal del PARC, implementó un tratamiento alternativo al Itraconazole, manteniendo rangos de temperatura mayores a 27 grados centígrados, para tratar de controlar el hongo Bd, resultando en una taza de mortalidad del 100 % de los individuos sometidos a dicho tratamiento. Debido a estos resultados se ha decidido no aplicar medidas de mitigación contra el patógeno, en los individuos restantes de *A. varius,* que se mantienen en cuarentena, hasta tanto no se determine un tratamiento de soporte o secundario para ayudar a los animales a sobrevivir infecciones secundarias causadas posiblemente por el estrés debido por los tratamientos de calor o con Itraconazole.

Algunas muestras histopatológicas de los individuos de *A. varius* muertos durante el tratamiento contra el hongo Bd, fueron enviadas a la Sociedad Zoológica de San Diego, California, para su análisis e identificación del posible nuevo patógeno que está afectando estos animales provenientes del área de Donoso. Las muestras biológicas fueron enviadas con los correspondientes permisos de exportación de la ANAM y el MIDA.

En definitiva la temperatura juega un papel fundamental en la supervivencia de *A. varius*, de manera que estamos implementando las medidas necesarias para lograr obtener un mayor control de dicho parámetro dentro de las instalaciones de cuarentena.

Iniciando con el reemplazo del temporizador que controla el aire acondicionado del recinto de cuarentena, el cual fue reemplazado por un modelo digital.



Foto 7. Temporizador digital en lugar de análogo.


Foto 8. A/C y techo sin aislante de cuarentena

4. Conclusiones

Al momento de la elaboración del presente informe en EVACC se mantienen en cuarentena un total de 59 individuos de las especies EdI**:** *Atelopus varius* (25), *Craugastor evanesco* (34), Mientras que en las instalaciones del PARC (Gamboa) se encuentra sólo *Oophaga vicentei* (7).

Recientemente se ha colectado muestras de piel para análisis del hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis,* mediante la utilización de la prueba diagnostica de PCR cuantitativo por parte del personal del proyecto PARC. Ver anexos para resultados obtenidos de muestras colectadas en Junio del presente, en instalaciones de cuarentena de EVACC.

Debido a los resultados negativos obtenidos por personal del PARC (Gamboa), en la prueba del tratamiento alternativo (aumento de la temperatura a 27°C) para tratar de controlar el hongo Bd en *A. varius* se ha decidido no aplicar ningún tipo de tratamiento para control especifico de este patógeno en individuos de *A. Varius,* provenientes del área de Donoso, hasta que se identifique la especie a la que pertenece el microorganismo, patógeno/oportunista que infecta a los animales durante o después de determinado tratamiento contra el Bd. Por lo que todos los individuos de anfibios provenientes de Donoso se mantienen en cuarentena tanto en el EVACC como en las instalaciones del PARC en Gamboa.

ANEXO

Anexo 1. Tabla de resultados de las muestras tomadas para análisis de PCR, para deteccion del hongo Bd

Swab No.	ID of collection	Swab duplicate	Swab date	Singlicate date	Plate	Position	Singlicate result	Triplicate date	Positives out of 3	Final result	Bd Load	Comments
137	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	A10	+	3-Jul-14	3	+	215.33	
128	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	A11	+	3-Jul-14	3	+	240.00	
146	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	A12	+	3-Jul-14	3	+	138.33	
118	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	B1	+	3-Jul-14	1	-	-	
154	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	B2	+	3-Jul-14	2	+	0.94	
120	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	B3	+	3-Jul-14	3	+	5.03	
119	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	B4	-			-	-	
174	*Atelopus varius*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	B5	+	3-Jul-14	3	+	146.33	
177	*Atelopus varius*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	B6	+	3-Jul-14	3	+	385.33	
Q34	*Ecnomiohyla veraguensis*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	B7	+	3-Jul-14	3	+	42.63	
126	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	B8	+	3-Jul-14	3	+	962.67	
267	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	B9	+	3-Jul-14	3	+	414.33	
265	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	B10	+	3-Jul-14	3	+	522.00	
261	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	B11	+	3-Jul-14	3	+	301.33	
259	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	B12	+	3-Jul-14	3	+	11.09	
230	*Atelopus varius*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	C1	+	3-Jul-14	3	+	50.33	
244	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	C2	+	3-Jul-14	3	+	112.53	
188	*Atelopus varius*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	C3	+	3-Jul-14	3	+	245.00	
173	*Atelopus varius*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	C4	+	3-Jul-14	3	+	1.36	
179-Q52	*Ecnomiohyla veraguensis*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	C5	+	3-Jul-14	3	+	4.20	
127	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	C6	+	3-Jul-14	1	-	-	
258	*Atelopus varius*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	C7	+	3-Jul-14	3	+	0.57	
274	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	C8	+	3-Jul-14	3	+	0.89	
264	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	C9	+	3-Jul-14	3	+	2.52	
153	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	C10	-			-	-	
143	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	C11	+	3-Jul-14	2	+	0.07	
150	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	C12	+	3-Jul-14	2	+	0.15	
202	*Atelopus varius*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	D1	+	3-Jul-14	1	-	-	
256	*Atelopus varius*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	D2	+	3-Jul-14	3	+	0.30	
250	*Atelopus varius*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	D3	+	3-Jul-14	2	+	0.86	
139	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	D4	-	3-Jul-14	1	-	-	We repeated the singlicate 3 times due to inhibition, and was positive at least once; therefore, we triplicated it.
99	*Atelopus varius*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	D5	-	3-Jul-14	2	+	0.21	We repeated the singlicate 3 times due to inhibition, and was positive at least once; therefore, we triplicated it.
98	*Atelopus varius* (2 juveniles)	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	D6	+	3-Jul-14	3	+	10.92	
252	*Atelopus varius*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	D7	+	3-Jul-14	0	-	-	
204	*Atelopus varius*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	D8	+	3-Jul-14	2	+	1.53	

142	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	D9	+	3-Jul-14	0	-	-	
123	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	D10	-			-	-	
111	*Atelopus varius*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	D11	+	3-Jul-14	1	-	-	
411	*Atelopus varius*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	D12	+	3-Jul-14	0	-	-	
275	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	E1	-			-	-	
2	*Ecnomiohyla miliaria*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	E2	-			-	-	
185	*Atelopus varius*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	E3	+	3-Jul-14	0	-	-	
255	*Atelopus varius*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	E4	+	3-Jul-14	3	+	6.85	
257	*Atelopus varius*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	E5	-			-	-	
138	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	E6	+	3-Jul-14	0	-	-	
125	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	E7	-			-	-	
242	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	E8	-			-	-	
272	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	E9	-			-	-	
253	*Atelopus varius*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	F1	-	3-Jul-14	2	+	3.66	We repeated the singlicate 3 times due to inhibition, and was positive at least once; therefore, we triplicated it.
254	*Atelopus varius*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	F2	-			-	-	
205	*Atelopus varius*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	F3	-	3-Jul-14	1	-	-	We repeated the singlicate 3 times due to inhibition, and was positive at least once; therefore, we triplicated it.
186	*Atelopus varius*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	F4	+	3-Jul-14	1	-	-	
210	*Ecnomiohyla miliaria*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	F5	-			-	-	
ABC1	*Ecnomiohyla miliaria*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	F6	Inhibited			Unknown	Unknown	We repeated the singlicate 3 times due to inhibition, and in all 3 ther reaction was inhibited.
217	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	F7	+	3-Jul-14	0	-	-	
198	*Atelopus varius*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	F8	-			-	-	
247	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	F9	-			-	-	
243	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	F10	-			-	-	
260	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	F11	+	3-Jul-14	2	+	1.47	
262	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	F12	+	3-Jul-14	3	+	2.58	
266	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	G1	-	3-Jul-14	1	-	-	We repeated the singlicate 3 times due to inhibition, and was positive at least once; therefore, we triplicated it.
269	*Craugastor evanesco*	A	24-Jun-14	27-Jun-14	116.2	G2	+	3-Jul-14	1	-	-	

203-Q102 *Atelopus. varius* This animal is part of the collection but was not listed in the spread sheet.